

# Bioadhesión sobre Alúmina: Propiedades superficiales

M.G. DONOSO<sup>1</sup>, M.L. GONZÁLEZ-MARTÍN<sup>1</sup>, A.M. GALLARDO MORENO<sup>1</sup>,  
A.M. VILAS<sup>1</sup>, J.M. BRUQUE<sup>1</sup>, J.L. GONZÁLEZ-CARRASCO<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Física. Universidad de Extremadura. Badajoz, España.  
<sup>2</sup>CENIM-CSIC, Madrid, España.

## Resumen

La alúmina es uno de los materiales cerámicos de mayor relevancia en usos biomédicos. Así, este trabajo hace una completa caracterización de su superficie a través de propiedades que son de especial importancia en aquellos procesos de interacción con superficies biológicas como son células y microorganismos. Tensión superficial, potencial zeta y rugosidad superficial se analizan utilizando métodos diversos. La tensión superficial se muestra en torno a  $35 \text{ mJ m}^{-2}$  aunque los valores dependen en muchos casos de la aproximación escogida y de los grupos de líquidos prueba necesarios para su determinación. El punto isoeléctrico aparece a  $\text{pH} = 4,6$  lo que indica una carga superficial negativa cuando la alúmina se encuentre inmersa en líquidos fisiológicos ( $\text{pH} \approx 7$ ). Los accidentes topográficos responsables de la macrorugosidad pueden considerarse de periodicidad en torno a  $25 \mu\text{m}$  presentando alta variabilidad a escalas inferiores, por ello, es importante determinar la rugosidad a escalas próximas al tamaño de las células que intervienen en el proceso de adhesión.

**Palabras clave:** biomateriales, caracterización superficial físico-química, energía libre superficial, potencial zeta, morfología superficial.

## Introducción

El diseño de biomateriales precisa conocer no solo sus propiedades mecánicas, sino también ciertas características de su superficie, que son las que determinan la interacción del material con el medio que le rodea –adhiriéndose, corroyéndose, mojándose, etc. Entre estas, destacan: energía libre superficial, hidrofobicidad, potencial y carga eléctrica superficial y morfología. Los parámetros energéticos superficiales son determinantes en la interacción del material con el medio. Así, una superficie de baja energía superficial tenderá a ser inerte y, por tanto, poco susceptible de ser modificada. Consecuencia directa son la hidrofobicidad y mojabilidad del material, que indican la respuesta del biomaterial en medio acuoso, fundamental en usos biológicos.

La inmersión de un material en un electrolito acuoso conduce a la aparición de una doble capa eléctrica, debido a las cargas superficiales y a la distribución de iones en el medio. Los parámetros fundamentales que caracterizan a los materiales desde el punto de vista eléctrico son el potencial zeta ( $\zeta$ ), valor del potencial eléctrico a una determinada distancia de la superficie del material, y su punto isoeléctrico (p.i.e.), o pH al cual  $\zeta$  se anula (1).

También se ha comprobado que la morfología de la superficie, en concreto su rugosidad, está estrechamente relacionada con la adhesión celular (2). El incremento de la rugosidad en un sólido produce a su vez un aumento de la adhesión bacteriana, debido no tanto a cambios drásticos en sus propiedades físico-químicas como al aumento del área superficial disponible para la adhesión (3). Ahora bien, el diferente tamaño de células y microorganismos, hace que la rugosidad del material no sea un parámetro absoluto en el análisis de procesos de bioadhesión, sino que requiera un estudio detallado según la aplicación concreta de éste.

Con todo ello este trabajo presenta la caracterización superficial de uno de los materiales cerámicos de mayor relevancia en usos biomédicos, la alúmina,

### Correspondencia:

E-mails autores por orden según el artículo:

[mgdonoso@unex.es](mailto:mgdonoso@unex.es), [mlglez@unex.es](mailto:mlglez@unex.es),  
[amparogm@unex.es](mailto:amparogm@unex.es), [amvilas@formatex.org](mailto:amvilas@formatex.org),  
[jmbrique@unex.es](mailto:jmbrique@unex.es), [jlg@cenim.csic.es](mailto:jlg@cenim.csic.es)

considerando tanto su energía libre superficial, y los diferentes modelos que permiten su cálculo, sus propiedades eléctricas y su nanotopografía.

La energía libre o tensión superficial del sólido se evalúa empleando la medida del ángulo de contacto ( $\theta$ ) que forma una gota de líquido sobre el sólido. Young (4) estableció que el ángulo de contacto era consecuencia del equilibrio de la gota bajo la acción de tres tensiones interfaciales: la sólido-vapor,  $\gamma_s$ , la sólido-líquido,  $\gamma_{SL}$ , y la líquido-vapor,  $\gamma_L$ :

$$\gamma_L \cos \theta = \gamma_s - \gamma_{SL}$$

A diferencia de  $\gamma_L$ , ni  $\gamma_s$  ni  $\gamma_{SL}$  son accesibles experimentalmente, por lo que para obtener  $\gamma_s$  es necesaria una relación adicional entre estos parámetros.

A este respecto existen dos grandes corrientes. Por un lado aquella planteada por Fowkes que asume que tanto las tensiones interfaciales como superficiales se pueden dividir en varias componentes, cada una de ellas relacionada con un tipo de interacciones o fuerzas intermoleculares, y por otro lado aquella que asume la existencia de una relación directa entre  $\gamma_{SL}$  con  $\gamma_s$  y  $\gamma_L$ .

Dentro de la primera corriente los modelos más destacados son:

1. El de Owens-Wendt-Kaelble que describe la tensión superficial como la suma de una componente dispersiva ( $\gamma^d$ ), debida a fuerzas de London (5), (6) y no dispersivas ( $\gamma^{nd}$ ), que engloba al resto de fuerzas presentes en la interfase. Por tanto,  $\gamma_{SL}$  se expresa como

$$\gamma_{SL} = \gamma_s + \gamma_L - 2\sqrt{\gamma_s^d \gamma_L^d} - 2\sqrt{\gamma_s^{nd} \gamma_L^{nd}} = \left(\sqrt{\gamma_s^d} - \sqrt{\gamma_L^d}\right)^2 + \left(\sqrt{\gamma_s^{nd}} - \sqrt{\gamma_L^{nd}}\right)^2$$

2. El de van Oss-Chaudhury-Good que establece un sumando debido a interacciones Lifshitz-van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), (London (5), (6) Keesom (7) y Debye (8)) y un segundo sumando debido a interacciones ácido-base ( $\gamma^{AB}$ ), descomponiéndose en un parámetro electrón-aceptor ( $\gamma^+$ ) y otro electrón-donador ( $\gamma^-$ ),  $\gamma^{AB} \equiv 2\sqrt{\gamma^+ \gamma^-}$ , de modo que

$$\gamma_{SL} = \gamma_s + \gamma_L - 2\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_L^{LW}} - 2\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_L^-} - 2\sqrt{\gamma_s^- \gamma_L^+}$$

La segunda corriente, iniciada por Neumann, postula la existencia de una función, «ecuación de estado», que relaciona directamente  $\gamma_{SL}$  con  $\gamma_s$  y  $\gamma_L$ . Según Kwok y col. 9:

$$\gamma_{SL} = \gamma_L + \gamma_s - 2\sqrt{\gamma_L \gamma_s} \left[ 1 - \beta (\gamma_L - \gamma_s)^2 \right] \quad \beta = 0,0001057 \text{m}^2 \text{mJ}^{-1}$$

Como se ha detallado, la carga eléctrica superficial se calcula a partir de  $\zeta$ . En el caso de superficies extensas  $\zeta$  se determina con medidas del potencial de flujo, según la expresión:

$$\zeta = \frac{\eta K_B}{\epsilon_0 \epsilon_r} \frac{dU}{dp}$$

Siendo U el potencial de flujo, p la presión del líquido que llena el capilar formado con el sólido,  $\eta$  es la viscosidad dinámica del fluido,  $K_B$  es la conductividad específica del fluido,  $\epsilon_0$  la permitividad del vacío y  $\epsilon_r$  la constante dieléctrica relativa del fluido.

## Métodos

La muestra de alúmina ( $Al_2O_3$ ) era lavada con agua destilada a  $60^\circ C$  frotando con una gasa, enjuagada con agua desionizada, sonicada durante 10 min, enjuagada y secada durante 1 hora a  $40^\circ C$ . Si no se utilizaba inmediatamente, se almacenaba un máximo de 24 horas en un desecador hasta su uso.

Para el cálculo de  $\gamma_{SL}$ , en concreto para la medida de  $\theta$ , se utilizó un goniómetro (Krüss, G10/DSA10). Los líquidos usados fueron: agua desionizada (A) (Mili-Q Plus System); formamida (F) ( $P > 99\%$ ); glicerol (G) ( $P > 99,5\%$ ); etilenglicol (E) ( $P > 99,5\%$ ); dimetilsulfóxido (Di), ( $P > 99,9\%$ ); diiodometano (D) ( $P > 98\%$ ); y bromoformo (B) ( $P > 99\%$ ) y  $\alpha$ -bromonaftaleno (AB) ( $P > 97\%$ ). Para estos líquidos, los valores de  $\gamma_L$ , sus componentes y parámetros fueron tomados de la bibliografía, según el criterio de van Oss (10) excepto para D para el que se han tomado según el criterio de Jańczuk y col. (11). Para el cálculo de  $\gamma_S$  es necesario el  $\theta$  de dos o tres líquidos, según se empleen los modelos de Owens-Wendt-Kaelble o van Oss-Chaudhury-Good, respectivamente. Utilizando Kwok y col. sólo es necesario el  $\theta$  de un único líquido, pero ante la imposibilidad de una resolución analítica de la ecuación, se realizó un programa para el cálculo de  $\gamma_S$  basándose en la búsqueda dicotómica de la raíz de una función.

En el cálculo del potencial zeta se empleó un dispositivo para la medida de potencial de flujo (Antón Paar KG). El líquido empleado como electrolito fue  $KCl 10^{-3} M$ , y para la variación del pH se utilizó  $HCl 0,1M$  y  $KOH 0,1M$ .

La rugosidad, como caracterización morfológica superficial, es uno de los parámetros topográficos más influyentes en la interacción célula-material. Este parámetro no es único en una superficie, ya que dependiendo del tamaño de la escala hablaremos de nanorugosidad, microrugosidad o macrorugosidad (12). En este caso se proporciona la rugosidad cuadrática media ( $R_{rms}$ ) que generalmente es el parámetro estadístico más significativo para describir y comparar diferentes

estructuras superficiales a diferentes escalas (13). Para estas medidas se ha empleado un microscopio de fuerza atómica (AFM) (Autoprobe CP, Park Scientific Instrument), que dispone de un escáner de un rango máximo de 100 mm en las direcciones x e y. Se usaron V-cantilevers con puntas de nitruro de silicio.

Todos los experimentos se realizaron a  $22^\circ C$ , descrita como temperatura ambiente.

## Resultados y discusión

Los resultados obtenidos de  $\theta$  para cada uno de los líquidos prueba se muestran en la Tabla 1. Se destaca el mayor valor para líquidos polares frente a los líquidos apolares.

Los resultados de  $\gamma_S$  y componentes para los modelos están en las Figs 1a, 1b, 1c. No es posible evaluar directamente  $\gamma_S$ , pero cada uno de los modelos predice valores diferentes de este parámetro. Incluso dentro de un mismo marco teórico el trabajar con conjuntos diferentes de líquidos para medir sus ángulos de contacto también provoca resultados ligeramente distintos. Este comportamiento indica que con fines comparativos es mejor emplear los mismos líquidos con los mismos modelos en diferentes sustratos.

Algunos aspectos destacados de los resultados obtenidos son que en los modelos que asumen la aditividad de la tensión superficial no todas las combinaciones de líquidos dan resultados físicamente aceptables debido a que los errores experimentales son superiores a la propia magnitud, también con el modelo de van Oss-Chaudhury-Good se pueden encontrar casos en que se predicen valores de la componente ácido-base negativa, carentes de sentido físico. Existen diversos trabajos en los que se analizan las características que deberían reunir los tripletes de líquidos que se utilicen (14-16), siendo quizás el método más aceptado el estudio de la estabilidad del sistema de ecuaciones [Ec. 3]. Así, se predice que serían válidos únicamente tríos de líquidos formados por uno no-polar y dos polares, siendo uno de ellos agua. Sin embargo, a la vista de nuestros resultados

$\theta_A$	$\theta_F$	$\theta_G$	$\theta_E$	$\theta_{Di}$	$\theta_D$	$\theta_B$	$\theta_{AB}$
79±3	67±1	80±2	64±1	43±3	52±2	35±2	36±2

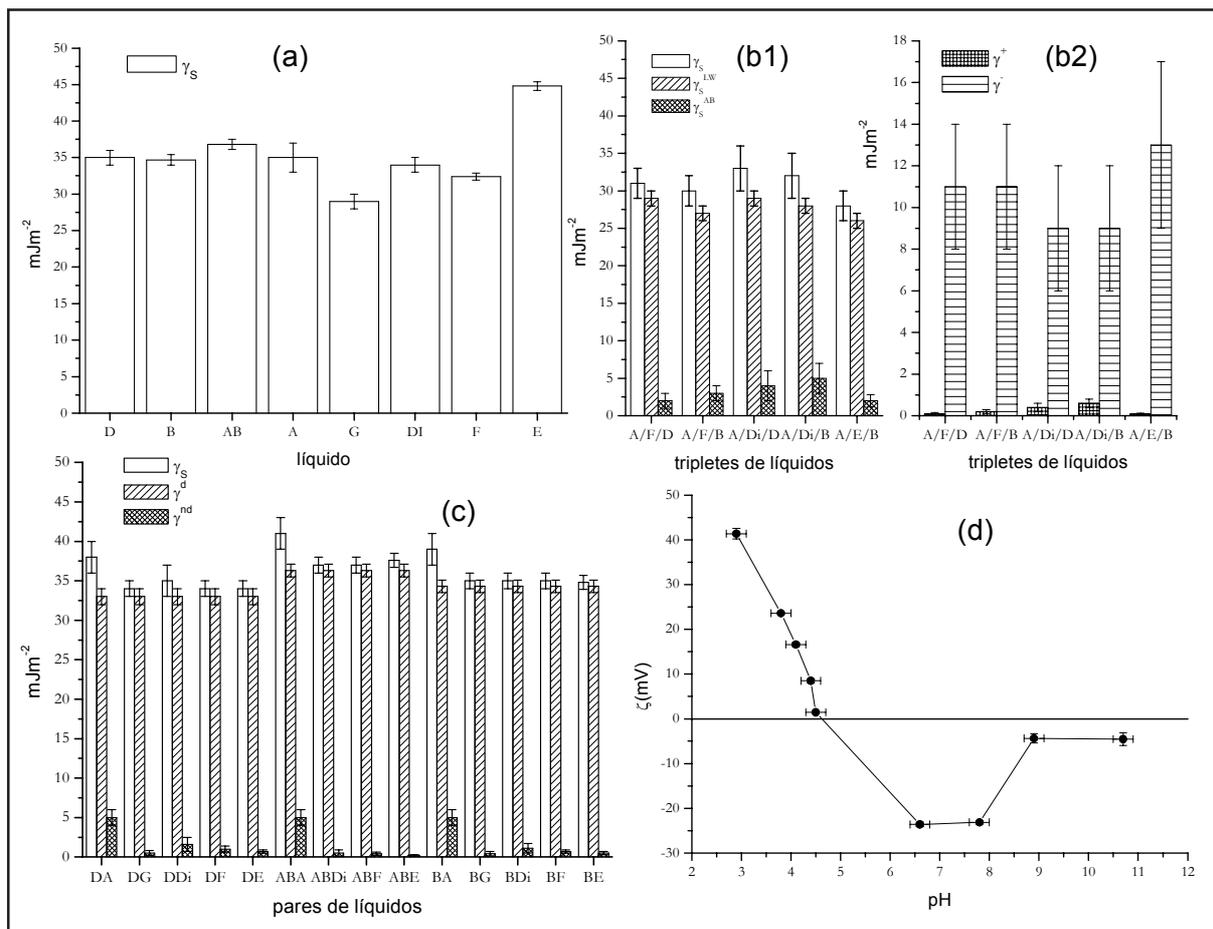
**Tabla 1.** Ángulo de contacto ( $\theta$ ) de los líquidos prueba y desviación estándar

podemos afirmar que si bien este criterio es una condición necesaria no es condición suficiente para asegurar unos resultados válidos. Lo que si podemos concluir, ya que existe un acuerdo entre todos los modelos, es en que la interacción de la alúmina con su entorno, mediante la adsorción o la adhesión de moléculas, células o microorganismos se va a producir principalmente mediante fuerzas de Lifshitz-van der Waals ( $\gamma^{LW}$  o  $\gamma^d > \gamma^{AB}$  o  $\gamma^{nd}$ ), y que, dentro de su comportamiento no dispersivo o ácido-base, es en mayor medida electrón donador que aceptador ( $\gamma > \gamma^+$ ).

En la Fig. 1d la dependencia de  $\zeta$  con el pH nos indica que el potencial eléctrico es muy sensible al pH, variando entre +40 mV y -25 mV al pasar de pH ácido a neutro, correspondiéndole el punto isoelectrónico a pH 4,6. Esto nos indica que dependiendo del medio fisiológico, concretamente de su pH, en el que el biomaterial fuese empleado se podría modificar su comportamiento de cara a la adhesión celular o microbiana. Aunque en general los valores del punto isoelectrónico de la alúmina citados en la bibliografía suelen estar entorno a 9

(17-20), otros autores han encontrado valores próximos al que hemos obtenido. Estas discrepancias en cuanto a los valores de los puntos isoelectrónicos se han asociado bien a distintas estructuras cristalinas o a la posible presencia de impurezas (21,22).

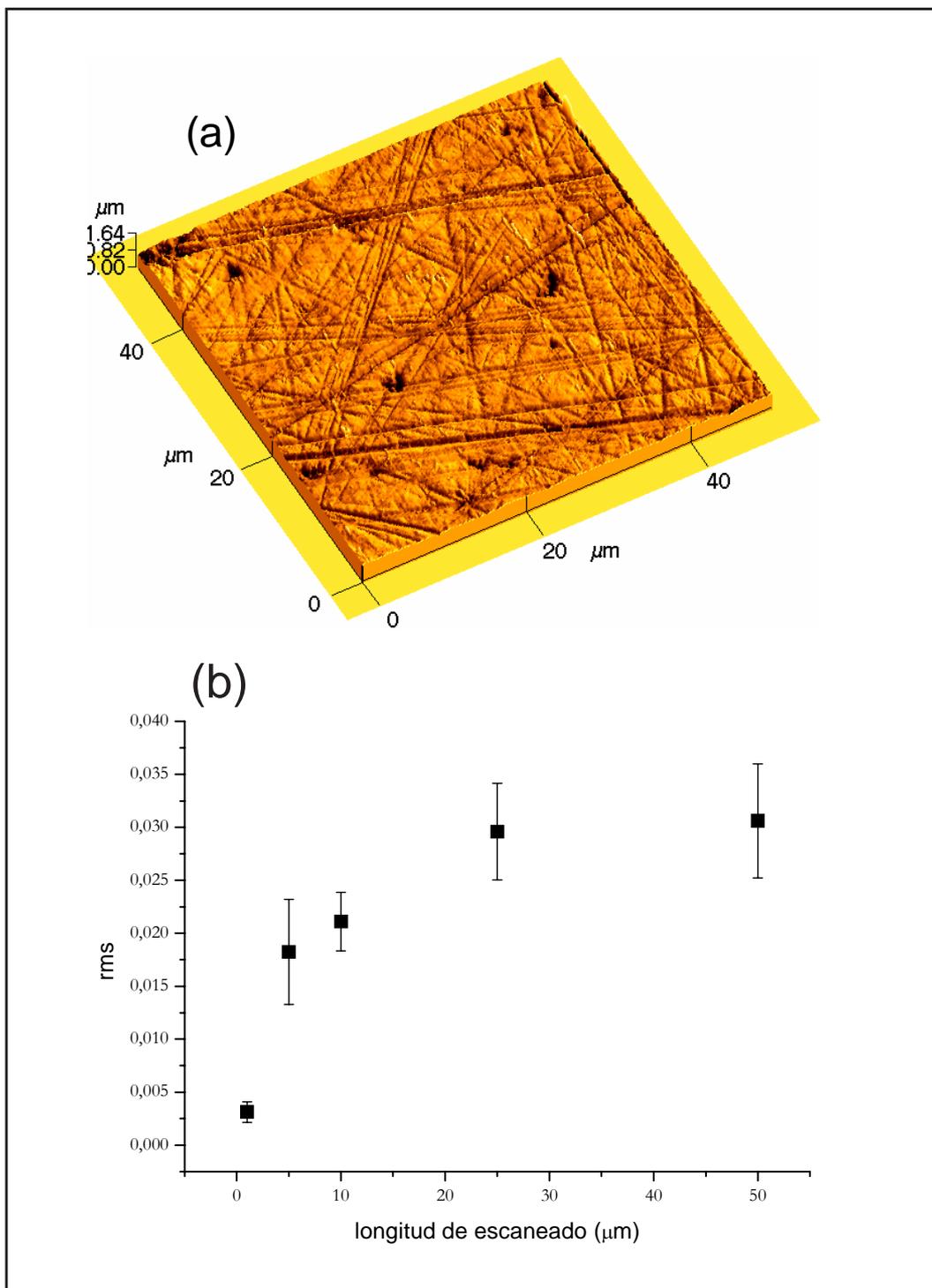
Es interesante comprobar que los valores de rugosidad (expresada como  $R_{rms}$ ) son función del tamaño de la distancia barrida, tal y como se muestra en la Fig. 2b, siendo la Fig. 2a una imagen superficial de la muestra.  $R_{rms}$  aumenta con la distancia, aunque a partir de  $\sim 25 \mu m$  comienza a ser constante. El comportamiento indica que los accidentes topográficos responsables de la macrorugosidad pueden considerarse de periodicidad en torno a este valor. La dependencia de la rugosidad superficial de la escala a la cual se mide sugiere que, en estudios sobre la influencia de la rugosidad en las interacciones célula-material, la rugosidad superficial que sería de interés correspondería a aquella determinada en escalas comparables con las dimensiones de las células.



**Figura 1.** Tensión superficial ( $\gamma_s$ ) de la alúmina según el modelo de Kwok y col (a), van Oss-Chaudhury-Good (b) y Owens-Wendt-Kaelble (c). Potencial zeta ( $\zeta$ ) en función del pH

Nuestros resultados muestran que la rugosidad superficial que «sentiría» o «vería» una célula de tamaño coloidal es completamente distinta de la de una célula de mayor tamaño, como levaduras, osteoblastos, fibroblastos, etc. De hecho, se empieza a hablar ya de rugosidad local en relación a este aspecto de las interacciones de células con materiales. Estos resultados muestran también que

técnicas de caracterización superficial de resolución micro y nanométrica probablemente proporcionan información más sensible para este tipo de estudios que técnicas que informan sobre las rugosidades superficiales más macroscópicas, donde las rugosidades superficiales se miden a veces a tamaños de hasta 1 mm.



**Figura 2.** Imagen AFM de la superficie de la alúmina (a) y valores de Rrms en función de la escala (b)

## Conclusiones

La tensión superficial ( $\approx 35 \text{ mJ m}^{-2}$ ) depende del modelo y de los grupos de líquidos utilizados, no pudiéndose hablar de un valor absoluto de  $\gamma_s$ . El efecto superficial de distintas condiciones ambientales debe estudiarse escogiendo un único modelo y un grupo de líquidos concretos. En cuanto a la carga eléctrica, la alúmina se muestra negativamente cargada a pH fisiológico y el punto isoeléctrico se obtiene para un pH de 4,6. Los accidentes topográficos responsables de la macrorugosidad presentan una periodicidad de  $\sim 25 \mu\text{m}$ .

## Bibliografía

1. **Thull R.** Physicochemical principles of tissue material interactions. *Biomolecular Engineering* 2002;19:43-50.
2. **Katsikogianni M., Missirlis Y.F., Katsikogianni M., Missirlis Y.F.** Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *European Cells and Materials* 2004;8:37-57.
3. **Terada A., Yuasa A., Tsuneda S., Hirata A., Katakai A., Tamada M.** Elucidation of dominant effect on initial bacterial adhesion onto polymer surfaces prepared by radiation-induced graft polymerization. *Colloids Surf.B: Biointerfaces* 2005;43:99-107.
4. **Young T. Philos.** *Trans. R. Soc., London*, 1805;95:65.
5. **F. London, Z. Phys. Chem.** 1930;11:222
6. **F. London, Trans. Faraday Soc.** 1937;33:8
7. **W. H. Keesom, Phys. Z.,** 1921;22:
8. **P. Debye, Phys. Z.** 1920;21:178
9. **Kwok D.Y., Neumann A.W.** Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Adv. Colloid and Interface Sci.* 1999;81:167-249.
10. **van Oss C. J.** *Interfacial Forces in Aqueous Media*, Marcel Decker, Nueva York (EEUU), 1994
11. **Jańczuk B., Kerkeb M.L., Bialopiotrowicz T., González-Caballero F.** Surface free energy of cholesterol and bile salts from contact angles. *J. Colloid Interface Sci.* 1992;151:333-42
12. **Bren L., English L., Fogarty J., Policoro R., Zsidi A., Vance J. et al.** 7th World Biomaterials Congress, Australia, 17-21 May 2004, p. 1121
13. **Vilas A.M, Nuevo M.J., Gonzalez Martin M.L, Labajos-Broncano L.**, *Mater. Sci. Forum* 2002;408-412:245-250.
14. **Della Volpe C, Maniglio D, Siboni S, Morra M.** Recent theoretical and experimental advancements in the application of the van Oss-Chaudhury – Good acid–base theory to the analysis of polymer surfaces II. Some peculiar cases *J. Adhesion Sci. Technol.* 2003;17:1477-56.
15. **Shalel-Levanon S, Marmur A.** Validity and accuracy in evaluating surface tension of solids by additive approaches. *J. Colloid Interface Sci.* 2003;262:489-499.
16. **Sharma PK, Rao KH.** Analysis of different approaches for evaluation of surface energy of microbial cells by contact angle goniometry. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2002;98:341-463
17. **Modi HJ, Fuerstenau DW J.** *Phys. Chem* 1957 ;61:640
18. **Yopps JA, Fuerstenau DW** The zero point of charge of alpha-alumina. *J. Colloid Sci.* 1964;19:61-71
19. **Griffiths,DA, Fuerstenau DW.** The effect of ph and temperature on the heat of immersion of alumina. *J. Colloid Interface Sci.* 1981;80:271-83
20. **Hayes,K F, Redden G, Ela W, Leckie J O.** Surface complexation models: An evaluation of model parameter estimation using FITEQL and oxide mineral titration data. *J. Colloid Interface Sci.* 1991;142:448-69.
21. **Larson I, Drummond CJ, Chan DYC,** Grieser F Direct Force Measurements between Silica and Alumina. *Langmuir* 1997;13: 2109-2112
22. **Franks GV, Meagher L.** The isoelectric points of sapphire crystals and alpha-alumina powder. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 2003;214:99-110